

DERWENT-ACC-NO: 1995-227402

DERWENT-WEEK: 199530

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Prepn. of 5-ammino-levulinic acid used  
as herbicide - by culturing methanosarcina genus microbe  
in medium contg. methanol and phosphate buffer and  
collecting prod. from sep'd. liq.

PATENT-ASSIGNEE: KUBOTA CORP [KUBI] , ZH CHIKYU KANKYO  
SANGYO GIJITSU  
KENKYU [CHIKN]

PRIORITY-DATA: 1993JP-0153205 (June 24, 1993)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES	MAIN-IPC	
JP 07135984 A 005	May 30, 1995 C12P 007/40	N/A

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
JP 07135984A June 24, 1993	N/A	1993JP-0153205

INT-CL (IPC): C12P007/40, C12P007/40 , C12R001:01

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 07135984A

BASIC-ABSTRACT:

5-aminolevulinic acid (ALA) producing Methanosarcina genus  
microbe having  
methanol assimilating ability is cultured in a medium contg.  
methanol and a  
buffer and the culture is sep'd. into solid and liq. The sped.  
liq. is

collected and ALA is collected from the sepd. liquid. The buffer is a phosphate buffer or a mixt. of a phosphate buffer and an acetate buffer.

ADVANTAGE - ALA is produced with high productivity. LA may be used as a herbicide.

In an example, methanoscarcina barkeri was cultured in a basal medium contg.

1.00 g/l ammonium chloride, 1.00 g/l Mg sulphate heptahydrate, 2.25 g/l NaCl, 0.25 g/l Ca chloride dihydrate, 0.30 g/l L-cysteine-HCl, 0.075 g/l Ti citrate, 20 ml/l vitamin soln., 6 ml/l mineral soln., 0.002 g/l Fe sulphate heptahydrate, 1% methanol, 1.2 g/l Na acetate, 0.348 g/l dipotassium hydrogen phosphate, 0.224 g/l potassium dihydrogen phosphate and 30 mM levulinic acid for 6 days. The culture was centrifuged and the supernatant was purified to collect ALA. The culture contained 11 ml/l ALA.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/2

TITLE-TERMS: PREPARATION AMMINO LAEVULINIC ACID HERBICIDE  
CULTURE GENUS MICROBE

MEDIUM CONTAIN METHANOL PHOSPHATE BUFFER COLLECT  
PRODUCT SEPARATE  
LIQUID

DERWENT-CLASS: C03 D16

CPI-CODES: C10-B02J; C14-V01; D05-C; D05-H01; D05-H13;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M2 \*01\*

Fragmentation Code

H1 H100 H181 J0 J011 J1 J171 J5 J581 M280  
M311 M312 M321 M332 M342 M349 M381 M382 M391 M416  
M620 M720 M903 M904 N131 N425 P140 Q233

Specflic Compounds

12329P

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 0270S; 1054S

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1995-104540

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

**特開平7-135984**

(43)公開日 平成7年(1995)5月30日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 P 7/40

// (C 12 P 7/40

C 12 R 1:01)

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

8114-4B

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全5頁)

(21)出願番号

**特願平5-153205**

(22)出願日

平成5年(1993)6月24日

(71)出願人 591178012

財団法人地球環境産業技術研究機構

京都府相楽郡木津町木津川台9丁目2番地

(71)出願人 000001052

株式会社クボタ

大阪府大阪市浪速区敷津東一丁目2番47号

(72)発明者 白川 昇

兵庫県尼崎市浜1丁目1番1号 株式会社

クボタ技術開発研究所内

(72)発明者 河杉 忠昭

兵庫県尼崎市浜1丁目1番1号 株式会社

クボタ技術開発研究所内

(74)代理人 弁理士 北村 修

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 5-アミノレブリン酸の製法

(57)【要約】

【目的】 生産性高くALAを製造する方法を提供すること。

【構成】 メタノサルシナバーケリーを、メタノール及び緩衝液を含んでなる培地で培養し、培養液を固液分離して分離液を取り出し、前記分離液から5-アミノレブリン酸(ALA)を採取して5-アミノレブリン酸を製造する場合に、前記緩衝液をリン酸緩衝液のみとする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 メタノサルシナ(Methanosarcina)属に属するメタノール資化性の5-アミノレブリン酸生産菌を、メタノール及び緩衝液を含んでなる培地で培養し、培養液を固液分離して分離液を取り出し、前記分離液から5-アミノレブリン酸(ALA)を採取する5-アミノレブリン酸の製法であって、前記緩衝液をリン酸緩衝液のみとする5-アミノレブリン酸の製法。

【請求項2】 メタノサルシナ(Methanosarcina)属に属するメタノール資化性の5-アミノレブリン酸生産菌を、メタノール及び緩衝液を含んでなる培地で培養し、培養液を固液分離して、分離液を取り出し、前記分離液から5-アミノレブリン酸(ALA)を採取する5-アミノレブリン酸の製法であって、前記緩衝液をリン酸緩衝液及び酢酸緩衝液とする5-アミノレブリン酸の製法。

【請求項3】 前記メタノール及び緩衝液を含んでなる培地が、

塩化アンモニウム(NH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>)

硫酸マグネシウム七水和物(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)

塩化ナトリウム(NaC<sub>1</sub>)

塩化カルシウム二水和物(CaC<sub>12</sub>·2H<sub>2</sub>O)

L-システイン塩酸塩

クエン酸チタン(III)

ビタミン溶液

ミネラル溶液

硫酸鉄七水和物(FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)

及びレブリン酸を含んでなり、前記ビタミン溶液が、ビオチン、葉酸、ピリドキシン塩酸塩、チアミン塩酸塩、リボフラビン、ニコチニ酸、パントテン酸カルシウム、p-アミノ安息香酸、リボ酸を含んでなり、前記ミネラル溶液が、硫酸亜鉛七水和物(ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、塩化マンガン四水和物(MnC<sub>12</sub>·4H<sub>2</sub>O)、ほう酸(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)、塩化銅二水和物(CuC<sub>12</sub>·2H<sub>2</sub>O)、塩化ニッケル六水和物(NiC<sub>12</sub>·6H<sub>2</sub>O)、モリブデン酸二ナトリウム二水和物(Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)、を含んでなる請求項1または請求項2記載の5-アミノレブリン酸の製法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、メタノサルシナ(Methanosarcina)属に属するメタノール資化性の5-アミノレブリン酸生産菌を、メタノール及び緩衝液を含んでなる培地で培養し、培養液を固液分離して分離液を取り出し、前記分離液から5-アミノレブリン酸(ALA)を採取する5-アミノレブリン酸の製法に関し、例えば、メタノサルシナバーケリー等のメタン細菌を用いて、除草剤として効果のあるALAを生産する技術に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、このような方法としては、メタノサルシナバーケリー等のメタン細菌を、メタノール、及

び、イミダゾール、リン酸水素二カリウム(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、リン酸二水素カリウム(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)からなる緩衝液及び、塩化アンモニウム(NH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>)、硫酸マグネシウム七水和物(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、塩化ナトリウム(NaC<sub>1</sub>)、塩化カルシウム二水和物(CaC<sub>12</sub>·2H<sub>2</sub>O)、L-システイン塩酸塩、クエン酸チタン(III)、ビタミン溶液、ミネラル溶液、硫酸鉄七水和物(FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)及びレブリン酸を含んでなる培地で培養し、ALAを生産することが考えられており、

緩衝液としては他の組成のものは用いられておらず、これらの組成は必須であると考えられていた。尚、前記ビタミン溶液とは、ビオチン、葉酸、ピリドキシン塩酸塩、チアミン塩酸塩、リボフラビン、ニコチニ酸、パントテン酸カルシウム、p-アミノ安息香酸、リボ酸を含んでなる組成物であり、前記ミネラル溶液とは、硫酸亜鉛七水和物(ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、塩化マンガン四水和物(MnC<sub>12</sub>·4H<sub>2</sub>O)、ほう酸(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)、塩化銅二水和物(CuC<sub>12</sub>·2H<sub>2</sub>O)、塩化ニッケル六水和物(NiC<sub>12</sub>·6H<sub>2</sub>O)、モリブデン酸二ナトリウム二水和物(Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)、を含んでなる組成物である。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】ところが、上述の従来の技術によってALAを生産する方法では、その生産性を向上させることは困難であった。そのためALAを高効率で生産する方法が望まれていた。そこで本発明の目的は、上記実情に鑑み、生産性高くALAを製造する方法を提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】この目的を達成するための第一発明の5-アミノレブリン酸の製法の特徴手段は、緩衝液をリン酸緩衝液のみとする点にあり、また、第2発明の5-アミノレブリン酸の製法の特徴手段は、緩衝液をリン酸緩衝液及び酢酸緩衝液とする点にあり、また、前記メタノール及び緩衝液を含んでなる培地が、塩化アンモニウム(NH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>)、硫酸マグネシウム七水和物(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、塩化ナトリウム(NaC<sub>1</sub>)、塩化カルシウム二水和物(CaC<sub>12</sub>·2H<sub>2</sub>O)、L-システイン塩酸塩、クエン酸チタン(III)、ビタミン溶液、ミネラル溶液を含んでなり、前記ビタミン溶液が、ビオチン、葉酸、ピリドキシン塩酸塩、チアミン塩酸塩、リボフラビン、ニコチニ酸、パントテン酸カルシウム、p-アミノ安息香酸、リボ酸を含んでなり、前記ミネラル溶液が、硫酸亜鉛七水和物(ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、塩化マンガン四水和物(MnC<sub>12</sub>·4H<sub>2</sub>O)、ほう酸(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)、塩化銅二水和物(CuC<sub>12</sub>·2H<sub>2</sub>O)、塩化ニッケル六水和物(NiC<sub>12</sub>·6H<sub>2</sub>O)、モリブデン酸二ナトリウム二水和物(Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)、を含んでなるものであれば尚良く、それらの作用効果は以下の通りである。

## 【0005】

【作用】一般にメタノサルシナ属に属するメタノール資化性のALA生産菌を培養すると、菌体の増殖に伴って前記菌体はALAを生産し、菌体外にALAを蓄積することが知られている。本発明者らは、メタノサルシナ属に属するメタノール資化性のALA生産菌を培養して、ALAを生産する場合に、培養する培地中のイミダゾール添加量を増加すると、前記ALA生産菌のALA生産性が低下するという新知見を得た。本発明はこの新知見に基づき成されたものである。

【0006】つまり、ALA生産菌を培養する培地中の緩衝液に含まれるイミダゾール量を増加すると、ALAの生産性が低下する訳であるから、イミダゾールにはALA生産菌がALAを生産する生産性を抑制する作用があると考えられる。従って、逆に、イミダゾールの量を減少させるとALAの生産性は向上するものであると考えられる。

【0007】また、本発明者らは、イミダゾールを添加した従来の培地においてALA生産菌を培養したとしてもイミダゾールを添加した従来の培地において、培養した場合と同様の培養度を示すことを実験的に証明し、ALA生産にイミダゾールは必須でないことを明らかにした。

【0008】従って、緩衝液をリン酸緩衝液のみとする、あるいは、リン酸緩衝液及び酢酸緩衝液とすることにより、従来どおりの培養度を維持しつつ、イミダゾールによるALA生産性抑制作用が全くなくなるために、高いALA生産性を得ることが出来るようになった。

【0009】さらに、ALA生産菌を培養する培地が、塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )  
硫酸マグネシウム七水和物 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )  
塩化ナトリウム ( $\text{NaCl}$ )  
塩化カルシウム二水和物 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )  
L-システィン塩酸塩  
クエン酸チタン(III)  
ビタミン溶液  
ミネラル溶液

を含んでなるものであった場合には、メタン細菌の一種であるメタノサルシナバーケリーを培養する場合の高い\*

塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	.....	1.00 g
硫酸マグネシウム七水和物 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	.....	1.00 g
塩化ナトリウム ( $\text{NaCl}$ )	.....	2.25 g
塩化カルシウム二水和物 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	.....	0.25 g
L-システィン塩酸塩	.....	0.30 g
クエン酸チタン(III)	.....	0.075 g
ビタミン溶液	.....	20 ml
ミネラル溶液	.....	6 ml
硫酸鉄七水和物 ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	.....	0.002 g

またビタミン溶液は、以下の組成であり、

ビオチン	.....	2 mg/リットル
------	-------	-----------

\* 培養度が得られ、それに伴うALA生産性も高く維持することができる。

## 【0010】

【発明の効果】結局、高いALA生産性が得られるようになったので、効率良く、大量にALAを生産することができ、それによりALA採取のための作業手間を少なくできる。さらに少ない作業手間で生産可能で、かつ、リン酸緩衝液のみからなる緩衝液は安価なので、ALA製造コストを下げることが出来るものである。

10 【0011】このALAは、除草剤として用いることの出来るものであるので、大量のALAを安価に提供することによって、除草を必要とする技術に対して大きく役に立てるようになった。

【0012】また、培地中に含まれるメタノールを供給するに、メタノールを含有する工場廃水等を用いれば、廃水中に含まれる有機成分等をメタン細菌によって生分解処理することができながら、従来は不要物として処分されていた廃水から有価物としてのALAを、安価に生産できるようになり、廃水処理技術及びALA生産技術としても有利に利用することが出来るようになった。

20 【0013】【実施例】以下に本発明の実施例を説明する。メタン細菌であるメタノサルシナバーケリー (*Methanosarcina barkeri*、以下バーケリーと称す) を基本培地(後述)にメタノールを1%及び酢酸ナトリウム ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )を1.2 g/リットル、リン酸水素二カリウム ( $\text{K}_2\text{HPo}_4$ ) 0.348 g/リットル、リン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.224 g/リットル、レブリン酸30 mMを添加してなる培地において、常法に従って

30 培養し、Marzella and Granick法 (Sasaki, K, et al. J. Ferment. Technol. Vol.65, No.5 511~515(1987) 参照) でALAの生成量を調べたところ、6日間の培養で上清液中に約11 mg/リットルのALAを生産したことがわかった。また、この培養物を遠心分離によって固液分離した、その上清液を分離液として取出し、その上清液を常法に従って分離精製することで、生産されたALAを採取することが出来た。

【0014】尚、基本培地は、1リットル中の組成が以下のようになっている。

5	6
葉酸	2 mg/リットル
ピリドキシン塩酸塩	10 mg/リットル
チアミン塩酸塩	5 mg/リットル
リボフラビン	5 mg/リットル
ニコチン酸	5 mg/リットル
バントテン酸カルシウム	5 mg/リットル
p-アミノ安息香酸	5 mg/リットル
リボ酸	5 mg/リットル

ミネラル溶液とは以下の組成である。

硫酸亜鉛七水和物 ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.1 g/リットル
塩化マンガン四水和物 ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )	0.04 g/リットル

ほう酸 ( $H_3BO_3$ )	0.3 g/リットル
塩化銅二水和物 ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ )	0.01 g/リットル
塩化ニッケル六水和物 ( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ )	0.01 g/リットル
モリブデン酸二ナトリウム二水和物 ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ )	0.03 g/リットル

以下にバーケリーを培養して、ALAを生産した場合の、バーケリーの培養度及びALA生産量の経時変化を調べた試験例及びその比較例を図面に基づいて示す。

【0015】〔試験例〕基本培地にメタノールを1%、及び、酢酸ナトリウム ( $CH_3COONa$ ) 1.2 g/リットル、リン酸水素二カリウム ( $K_2HPO_4$ ) 0.348 g/リットル、リン酸二水素カリウム ( $KH_2PO_4$ ) 0.224 g/リットルの組成となる緩衝液、及び、レブリン酸30 mMを添加してなる培地においてバーケリーを培養し、その培養度を、バーケリーを培養して発生するガス量によって調べるとともに、前述と同様にALAの生成量を調べた。

【0016】〔比較例〕基本培地にメタノールを1%、及び、酢酸ナトリウム ( $CH_3COONa$ ) 1.2 g/リットル、リン酸水素二カリウム ( $K_2HPO_4$ ) 0.70 g/リットル、リン酸二水素カリウム ( $KH_2PO_4$ ) 0.45 g/リットル、イミダゾール2.72 g/リットルの組成となる緩衝液、及び、レブリン酸30 mMを添加してなる培地においてバーケリーを培養し、その培養度を、バーケリーを培養して発生するガス量によって調べるとともに前述と同様にALAの生成量を調べた。

【0017】これらの結果を、培養経過を図1に、ALA生産量を図2に示す。尚、試験例における結果は実線、比較例における結果を破線で示す。

【0018】図1から、酢酸緩衝液及びリン酸緩衝液からなる緩衝液を用いた(試験例)場合には、従来のようにイミダゾールを含んでなる緩衝液を用いた(比較例)場合と同等の培養経過を示すことがわかり、イミダゾールはバーケリーの培養度には影響を与えていないことがわかる。また、図2から、試験例の場合、6日でほぼ原料を消費して、約11 mg/リットルのALAを生産することが出来るものの、比較例の場合、その生産性は低く、6日目においても約7.5 mg/リットルのALA\*50

\*しか生産しておらず、イミダゾールはALAの生産性に悪影響を与えてることがわかるとともに、本発明のALAの製法によれば、従来の約1.5倍のALA生産が可能であることがわかった。

【0019】〔別実施例〕先の実施例においてはバーケリーを培養してALAを生産したが、他のALA生産菌でも良く、さらに、バーケリーを用いてALAを生産する場合にレブリン酸を培地に添加することによりALAの生産性が向上することが知られているために、これを添加して培養を行った。しかし、レブリン酸以外にもALAの生産性を向上させる物質は知られており、例えば $\beta$ -アラニン、 $\alpha$ -アミノ酸等他の物質を添加してALA生産性を高めて培養を行うことも可能である。

【0020】また、酢酸ナトリウムは、バーケリーの増殖性を向上する目的で緩衝液に加えてあるが、これについても必ずしも添加しなくとも、ALAの生産が可能であるため、酢酸ナトリウムについても必ずしも本発明に必要なわけではない。つまり、本発明に用いる緩衝液はリン酸緩衝液のみでもよい。

【0021】また、先の実施例に挙げた基本培地は、バーケリーを培養する場合の培地の一例であって、これに限る訳ではなく、微生物の種類等に応じて種々変更することは可能である。

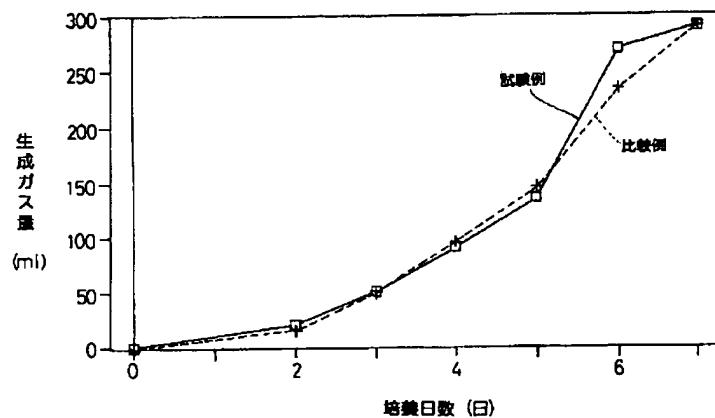
【0022】また、ALA生産菌の培養液からALAを採取する方法についても、培養物を膜分離により固液分離する等の他の方法で固液分離することも可能である。しかし、遠心分離で固液分離すると共にイオン交換樹脂で精製すれば、容易に高純度のALAが得られる利点がある。

#### 【図面の簡単な説明】

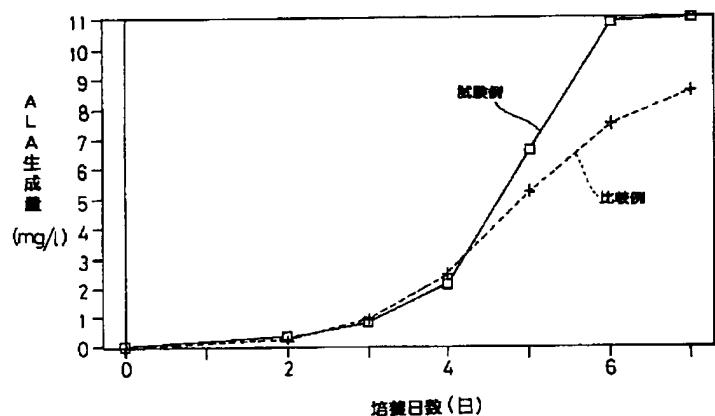
【図1】微生物(バーケリー)の培養経過を示すグラフ

【図2】ALA(5-アミノレブリン酸)の生成を示すグラフ

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(72)発明者 庄林 学  
兵庫県尼崎市浜1丁目1番1号 株式会社  
クボタ技術開発研究所内